

## SALMONELOSIS ASOCIADA CON LA MARIHUANA: UN BROTE MULTIESTATAL INVESTIGADO POR MAPEO DE FRAGMENTOS DE ACIDOS NUCLEICOS DE PLASMIDOS<sup>1</sup>

David N. Tylor, I. Kaye Wachsmuth, Yung-Hui Shangkuan, Emmett V. Schmidt,  
Tymothy J. Barrett, Janice S. Schrader, Charlene S. Scherach, Harry B. McGee,  
Roger A. Feldman y Don J. Brenner<sup>2</sup>

Entre enero y febrero de 1981 se notificaron en Ohio, Michigan, Georgia y Alabama 85 casos de enteritis causada por *Salmonella muenchen*. La investigación inicial no logró implicar a una fuente alimenticia como vehículo común, pero en Michigan, el 76% de los enfermos, en contraste con el 21% de los testigos, confesaron la exposición personal o doméstica a la marihuana ( $P < 0,001$ , riesgo relativo = 20). Las muestras de marihuana obtenidas de los hogares de los enfermos contenían hasta  $10^7$  *S. muenchen* por gramo.

Los aislamientos de *S. muenchen* relacionados con el brote eran sensibles a todos los antibióticos y eran fenotípicamente indistinguibles de otras *S. muenchen*. No obstante, se reveló por mapeo de fragmentos de ácidos nucleicos de plásmidos que todos los aislamientos relacionados con la exposición a la marihuana contenían dos plásmidos de bajo peso molecular (3,1 y 7,4 megadalton), los cuales estaban ausentes en las cepas control. Un análisis de los plásmidos de los aislamientos mostró que los brotes en Ohio, Michigan, Georgia y Alabama estaban relacionados, y el análisis de los aislamientos enviados de otros varios estados demostró que los casos asociados con la marihuana podían haberse extendido hasta California y Massachusetts.

Se considera que la *Salmonella* es uno de los patógenos más frecuentes transmitidos a través de los alimentos. Cada año se notifican a los Centros para el Control de Enfermedades más de 50 brotes causados por este microorganismo. Aunque existen más de 1.800 serotipos diferentes de *Salmonella*, 10 serotipos explican más de las dos terceras partes del total de los aislamientos en los Estados Unidos (1). La mayoría de los brotes resultan de la exposición de las personas a un producto alimenticio o comida, pero la exposición a productos que son contaminados en el momento de su producción y que tienen una amplia distribución puede conducir a brotes en varios estados. Brotes de ese tipo se han investi-

gado con el máximo éxito cuando han estado causados por serotipos poco frecuentes o serotipos comunes con un patrón de sensibilidad a antibióticos o un patrón de fagólisis poco común. Estos brotes implicaban al chocolate contaminado con *S. eastbourne* (2), a las cápsulas de color carmín con *S. cubana* (3), a la hamburguesa y al rosbif precocinado con *S. newport* (4, 5) y a la leche en polvo con *S. newbrunswick* (6).

En enero de 1981 investigamos dos brotes de salmonelosis causados por cepas de *S. muenchen* multisensibles que aparecieron en Ohio y en Michigan. La ocurrencia simultánea de dos brotes debidos al mismo serotipo en estados adyacentes sugería un vehículo común. Se investigaron los brotes causados por la marihuana contaminada, que no había sido reconocida previamente como vehículo de transmisión de patógenos bacterianos. Mediante el análisis de los perfiles de los plásmidos (mapeo de fragmentos de ácidos nucleicos), pudimos distinguir la cepa epidémica de *S. muenchen* de aparición frecuente y demostrar la extensión del brote. Antes del brote, el uso de mapeo de fragmentos de ácidos nucleicos

Fuente: *The New England Journal of Medicine* 306 (21):1249-1253, 1982.

<sup>1</sup>Presentado en la Vigésimoprimer Conferencia Interciencia de Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia, Chicago, 6 de noviembre de 1981.

<sup>2</sup>Sección de Bacteriología Entérica y Epidemiología, División de Enfermedades Bacterianas, Centro para Enfermedades Infecciosas, Centros para el Control de Enfermedades, Atlanta, Georgia, E.U.A.

de plásmidos se había limitado a las investigaciones de infecciones nosocomiales no entéricas (7).

## MÉTODOS

### Epidemiología

Identificamos a enfermos con la infección por *S. muenchen* y obtuvimos las historias de los casos mediante la revisión de los registros hospitalarios y de los departamentos de salud, y por entrevistas a los enfermos de Ohio y Michigan. Definimos como caso a aquella persona que siendo el primer miembro de la familia que se puso enfermo se le aisló *S. muenchen* de la sangre o de las heces durante el período comprendido entre diciembre de 1980 y febrero de 1981. Estos estudios iniciales condujeron a un estudio de casos y testigos en el que se realizó telefónicamente una encuesta sobre alimentos, restaurantes, lugares de diversión y contacto con animales de 32 familias de casos y de testigos en Ohio. Las familias testigos se seleccionaron de forma aleatoria en los barrios de los casos mediante una guía de calles. Se excluyó a las familias testigos en las que un miembro de la familia había padecido un proceso diarreico de más de dos días de duración en los dos últimos meses. El estudio de casos y testigos inicial condujo a una segunda encuesta a las familias de los casos, en la que se obtuvo información específica sobre las interrelaciones con otros casos y sobre el uso de fármacos prohibidos.

Para determinar si la marihuana se utilizaba con más frecuencia en los hogares de los casos que en los de los testigos, llevamos a cabo en Michigan un estudio de casos y testigos con 17 casos y 34 testigos pareados por edad y vecindad. Se analizaron estadísticamente, según el método de Miettinen (casos apareados con un número variable de testigos), las respuestas de los casos y de los testigos (8). Se solicitaron muestras de marihuana (menos de 5 g) a las familias de los casos de Ohio, Michigan, Georgia y Alabama y se sometieron a análisis microbiológico.

### Investigaciones de laboratorio

Las salmonelas fueron aisladas de muestras de heces y de sangre por los laboratorios hospitalarios mediante técnicas de aislamiento estándar, y fueron serotipadas por los departamentos estatales de salud (9). Se determinaron las reac-

ciones bioquímicas (9) y la susceptibilidad a los antibióticos (10) de todos los aislamientos, incluidas las cepas control de *S. muenchen* no relacionadas con las epidemias o con el uso de la marihuana. Se efectuó una estimación cuantitativa de la contaminación por salmonela en las muestras de marihuana mediante recuentos en placa de los aislamientos de *S. muenchen*. Para confirmar que las muestras eran de marihuana y para determinar en cada muestra las cantidades de los diferentes cannabinoides presentes, se enviaron muestras contaminadas con salmonela al Instituto de Investigaciones de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Mississippi para un análisis de cromatografía de gases (11).

El perfil de los plásmidos de 116 aislamientos de *S. muenchen* fue determinado por electroforesis-gel-agarosa del ADN plasmídico. Las cepas de *S. muenchen* y de las salmonelas relacionadas antigénicamente, previamente aisladas de diferentes partes de los Estados Unidos, también se analizaron por electroforesis-gel-agarosa para que sirvieran de testigos. Los caldos de cultivo fueron lisados con sulfato de sodio dodecílico con alta salinidad (12), o con detergente no iónico Triton X-100 (13) y a continuación fueron precipitados por centrifugación (14).

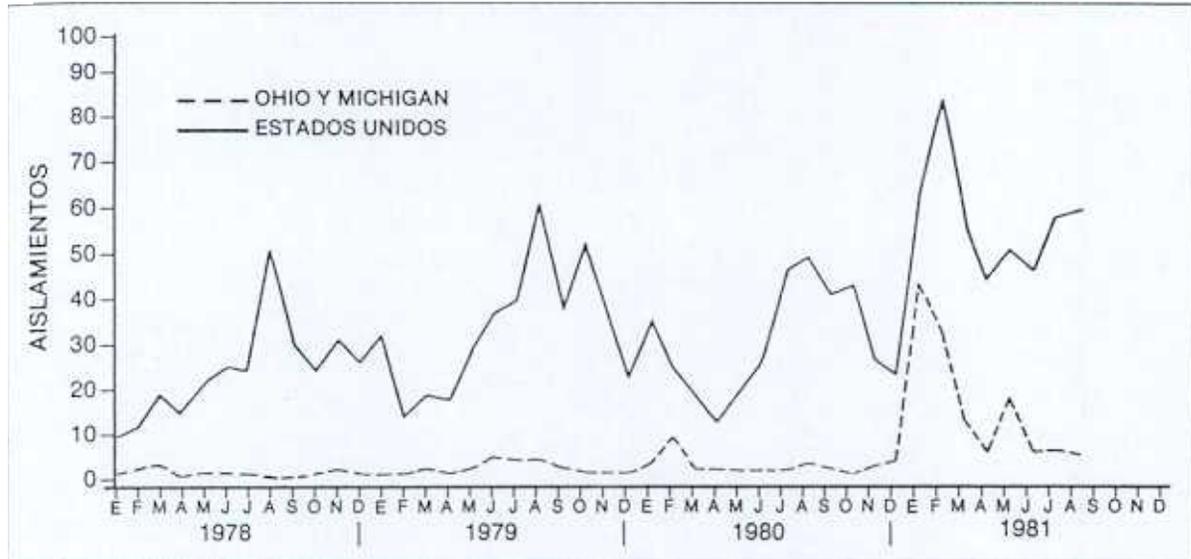
Todo el ADN plasmídico fue analizado por electroforesis con agarosa en bloque vertical (15). El ADN plasmídico de la cepa V517 de *Escherichia coli* servía como control para el peso molecular (16). Se preparó ADN plasmídico purificado de las cepas seleccionadas por digestión con la endonucleasa de restricción Hpa II (Laboratorios Miles) (17). El bacteriófago ADN lambda con un conocido patrón de segmentación Hpa II se utilizó como control para la digestión completa enzimática del ADN.

## RESULTADOS

### Casos en Ohio y Michigan

El Sistema Nacional de Vigilancia de la Salmonela recibe cada año de 300 a 400 informes de aislamiento de *S. muenchen* de seres humanos (1). Como los aislamientos de muchos otros serotipos de salmonela, los de este serotipo se notifican con más frecuencia durante los meses de verano. En 1981, en contraste con años previos, hubo un marcado aumento en el número notificado de aislamientos (Figura 1). En enero de 1981 se notificaron 63 aislamientos de este sero-

Figura 1. Aislamientos de *Salmonella muenchen* en los casos de infección en los Estados Unidos, desde enero de 1978 hasta finales de agosto de 1981.



tipo, y 87 en febrero de 1981; el 70% de los aislamientos de enero y el 35% de los de febrero se notificaron en Ohio y Michigan.

La distribución por edad de los casos era similar en ambos estados. La edad media de todos los casos era de 10 años; la de los enfermos con menos de un año de edad, era de cinco meses. Se comparó la distribución por edad de los casos de este brote con la distribución por edad notificada en 1980. En estos dos brotes, 14 de 62 personas (23%) tenían de 20 a 29 años de edad, comparado con 33 de 268 (12%) en los que se aisló *S. muenchen* en 1980. Este aumento era significativo ( $P=0,04$ , prueba exacta de Fisher, dos colas) y estaba asociado con una reducción, desde un 20% al 8%, en la proporción de personas con 50 años o mayores. Los síntomas predominantes eran diarrea (90%), fiebre (81%), dolor abdominal (73%), diarrea con sangre (54%) y náuseas y vómitos (44%). Treinta y nueve de los casos (62%) fueron hospitalizados. La duración media de la enfermedad fue de ocho días.

El estudio de casos y testigos en Ohio no logró correlacionar un lugar (tal como un supermercado, restaurante, bar o centro de recreo) o un alimento (tal como un producto de carne, queso, aliño, condimento, o dulces de fiesta—pastel de chocolate o de frutas) con el brote. No obstante, descubrimos que el 44% de las familias de los casos y ninguna de las de los testigos tenían

niños menores de un año de edad ( $P<0,001$ ), y que todas las familias de los casos pero solo el 41% de las de los testigos incluían a personas de 15 a 35 años de edad ( $P<0,001$ ).

Debido a la asociación con los adultos jóvenes, la falta de asociación con un alimento, restaurante o actividad, y alguna información de tipo anecdótico, preguntamos sobre el uso de fármacos prohibidos durante una segunda entrevista a los miembros de las familias de los casos. Ninguno de los miembros de las familias declaró que usaban drogas excepto la marihuana, pero la exposición a la marihuana parecía ser alta. En Ohio y Michigan, 49 enfermos (78%) habían estado expuestos a la marihuana: 13 enfermos (21%) declararon el uso personal de marihuana, 22 (35%) habían estado expuestos a la marihuana en la casa, pero no la habían fumado, y 14 (22%) habían estado expuestos a la marihuana fuera de la casa pero negaron haberla fumado; 14 (22%) no tenían exposición conocida a la marihuana.

Poco tiempo después de descubrir la asociación en Ohio, realizamos el segundo estudio de casos y testigos en Michigan. El 76% de los enfermos, comparados con el 21% de los testigos, notificaron la exposición personal o familiar a la marihuana (Cuadro 1). La probabilidad de que los enfermos hubieran estado expuestos a la marihuana en las dos semanas anteriores a su enfermedad era 20 veces mayor que la de los tes-

**Cuadro 1. Exposición personal o familiar a la marihuana entre los casos y los testigos de Michigan, desde enero hasta finales de febrero de 1981.<sup>a</sup>**

		Testigos			Totales
		Ambas sí	1 sí 1 no	Ambas no	
Casos	Sí		4	8	13
	No	0	1	3	4
Totales		1	5	1	17

<sup>a</sup>Existía una diferencia significativa entre los casos y los testigos ( $P=0,0006$ , riesgo relativo=20).

tigos ( $P<0,001$ ). Los casos negaron formalmente la ingestión de marihuana en los alimentos.

#### Casos en otros estados

Como resultado de los estudios en Michigan y Ohio, dos casos de enteritis causada por *S. muenchen* fueron notificados en Alabama y 21 casos fueron notificados en Georgia (18, 19). Los dos enfermos de Alabama tenían menos de seis meses de edad y padecían diarrea; uno fue hospitalizado. Las madres de ambos niños fumaban marihuana en la casa. En Georgia, se consiguió obtener información sobre 15 de los enfermos; 10 de los enfermos eran menores de siete años, y cinco tenían entre 20 a 27 años. Todos los adultos jóvenes fumaban marihuana, y los padres de siete de los 10 niños afectados la fumaban en la casa.

#### Investigaciones de laboratorio

Se aisló *S. muenchen* de muestras de marihuana de tres de las cuatro familias de casos de Ohio, y de una familia de casos en Michigan, en Alabama y en Georgia. La estimación del recuento en placa de los microorganismos de salmonela por cada gramo de marihuana indicó niveles extremadamente altos de contaminación (Cuadro 2). Los microorganismos aislados en las otras tres muestras fueron similares. El análisis bioquímico de las muestras sospechosas de marihuana confirmó que eran de marihuana, pero el tipo no sugería su país de origen.

Las cepas de *S. muenchen* aisladas de los enfermos y de la marihuana en Ohio y en Michigan eran sensibles a todos los antibióticos probados y eran bioquímicamente indistinguibles de las *S. muenchen* control (en una serie de 36 reacciones de prueba). Inicialmente, se analizaron las cepas de la epidemia de Ohio y se descubrió que contenían dos plásmidos con pesos moleculares de 3,1 y 7,4 megadalton... Subsecuentemente, se encontraron estos plásmidos en todas las cepas, independientemente de la sensibilidad antibiótica, que fueron aisladas de los enfermos implicados en los brotes por marihuana contaminada investigados. Ninguna de las cepas control aisladas en años anteriores o recientemente de fuentes conocidas como negativas (es decir, fuentes no relacionadas con la marihuana) contenía los dos mismos plásmidos. El análisis más detallado de los plásmidos de las cepas de *S. muenchen* aisladas de enfermos durante el período de diciembre de 1980 hasta el final de febrero de 1981 en nueve estados identificó este

**Cuadro 2. Características de la salmonela aislada de las muestras de marihuana obtenidas en los hogares de los casos, febrero de 1981.**

Muestra	Estado	Serotipo	Recuento de colonias por gramo <sup>a</sup>	Otros micro- organismos encontrados <sup>b</sup>	Sensibilidad antibiótica <sup>c</sup>
A	Ohio	<i>S. muenchen</i>	$8 \times 10^5$	1,2,3,4	S
B	Ohio	<i>S. muenchen</i>	$4 \times 10^7$	1,2,3,4	S
		<i>S. oslo</i>	$4 \times 10^6$	NT	S
C	Ohio	<i>S. muenchen</i>	$5 \times 10^7$	1,2,3,4,5	S
D	Michigan	<i>S. muenchen</i>	CNS	NP	S
E	Georgia	<i>S. muenchen</i>	CNS	NP	S
F	Alabama	<i>S. muenchen</i>	CNS	NP	R

<sup>a</sup>CNS significa una cantidad no suficiente para la determinación.

<sup>b</sup>1 significa *Staphylococcus epidermidis*, 2 *Escherichia coli*, 3 *Klebsiella pneumoniae*, 4 estreptococos del Grupo D, y 5 *Pseudomonas aeruginosa*. NP significa no probado.

<sup>c</sup>S significa sensibilidad a todos los antibióticos probados, y R resistencia a la ampicilina.

patrón de plásmidos en los residentes de California, Arizona y Massachusetts (Cuadro 3). Las digestiones similares por la endonucleasa de restricción del ADN plasmídico de la *S. muenchen* en Ohio, Georgia y California confirmaron que estaban relacionados por lugares de reconocimiento del Hpa II [secuencia nucleótica CCGG (citosina-citosina-guanina-guanina)] y tamaño...

### DISCUSION

En esta investigación, concluimos que dos brotes simultáneos de gastroenteritis por *S. muenchen* en Ohio y en Michigan fueron causados por la exposición a la marihuana contaminada, después de demostrar que el uso de la marihuana era significativamente más prevalente en las familias de casos que en las de testigos, y después de aislar la *S. muenchen* de las muestras de la marihuana de las familias de casos en ambos estados.

**Cuadro 3. Perfiles de los plásmidos de la *Salmonella muenchen*.**

Origen del microorganismo	Plásmidos característicos <sup>a</sup>	Ninguno u otros plásmidos	
		No.	cepas
Alabama	4 <sup>b</sup>	—	—
Arizona	4	—	—
Georgia	4	—	—
West Virginia	4	—	—
Ohio	12 <sup>b</sup>	—	—
Michigan	26 <sup>b</sup>	—	2
Massachusetts	9	—	11
California	3	—	12
Wisconsin	—	—	5
New Hampshire	—	—	—
Washington (state)	—	—	4
Pennsylvania	—	—	3
Texas	—	—	7
Vermont	—	—	3
Testigos C2	—	—	10 <sup>c</sup>
Testigos con <i>S. muenchen</i>	—	—	16 <sup>c</sup>
	67	—	75

<sup>a</sup>Los tamaños de los plásmidos característicos son aproximadamente  $3 \times 10^6$  y  $7 \times 10^6$  dalton.

<sup>b</sup>Este número incluye cepas de *S. muenchen* aisladas directamente de la marihuana.

<sup>c</sup>Cepas control obtenidas de la colección en existencia en los Centros para el Control de Enfermedades.

Cuando la marihuana está lista para la venta, se almacena a la temperatura ambiente en una atmósfera seca. Bajo estas condiciones, las salmonelas pueden permanecer viables pero no crecen. Los estudios cuantitativos efectuados en estas muestras indicaron que era improbable que el grado de contaminación ( $10^6$  a  $10^7$  salmonelas por gramo de marihuana) hubiera ocurrido a través de la simple inoculación por las manos de los usuarios contaminadas por otras fuentes. Las similitudes entre la microflora que acompañaba a las tres muestras también sugirieron la contaminación debida a la mezcla directa de la marihuana con heces animales, lo cual pudo suceder como resultado de la fertilización con estiércol sin tratar, contaminación inadvertida durante el secado o almacenaje, o simplemente una adulteración directa con estiércol seco para aumentar el peso del producto.

La Agencia de Control de Drogas de los Estados Unidos estimó que la marihuana utilizada en este país en 1980 se cultivó en Colombia (75%), México (11%), Jamaica (7%) y los propios Estados Unidos (7%) (20). La Agencia sugiere que la mayoría de la marihuana importada de México se queda en el suroeste de los Estados Unidos, mientras que la cultivada en los Estados Unidos no se distribuye fuera del estado en el que se cultiva. La distribución de costa a costa de esta marihuana nos llevó a sospechar que el país de origen sería Colombia o Jamaica.

La investigación de este brote reveló un nuevo vehículo para la infección por salmonela capaz de provocar un brote multiestatal; también aumentó nuestro conocimiento sobre la infección al mostrar que un vehículo que no es ingerido puede causar una salmonelosis. La marihuana puede contaminar los dedos durante la preparación de un cigarrillo de marihuana o los labios mientras que se fuma. En este brote, el número de salmonelas ingeridas por la contaminación entre mano y boca o cigarrillo y boca era lo suficiente para causar una infección en los adultos jóvenes. Los casos en los niños pueden haberse producido por el contacto directo con restos de marihuana, contacto con las personas infectadas, o por la contaminación secundaria de los alimentos.

El mayor grado de contaminación y el uso prolongado o la exposición pueden ser suficientes para explicar la infección, pero puede ser que otros factores del huésped puedan haber estado implicados. En otro estudio, se descubrió

que los usuarios de *Cannabis* por largo tiempo tenían poco o ningún ácido gástrico y podían infectarse con un número menor de *Vibrio cholerae* 01 que los que se necesitaban para infectar a otros voluntarios (21). Ya que la acidez gástrica actúa como una barrera importante contra los microorganismos ingeridos, esta acidez reducida podía haber predispuesto a este grupo a una infección después de que hubieran ingerido inóculos más pequeños. En las personas que fumaban marihuana contaminada, es posible que algunos microorganismos de salmonela fueran inhalados dentro de los pulmones.

La proporción de casos en niños (el 50% de los cuales tenían menos de 10 años) en este brote fue similar a la notificada al Sistema de Vigilancia de la Salmonela (40%) (1). En este brote, es cierto que los niños estaban menos expuestos al vehículo que los adultos. Esto sugiere que en un brote de salmonelosis, aunque una gran proporción de los casos hubiesen ocurrido en la población infantil y en los niños, la investigación para determinar el vehículo de transmisión debería incluir el examen de exposiciones comunes en los adultos de las familias.

El análisis del ADN plasmídico de estas cepas relacionadas epidemiológicamente identificó dos pequeños plásmidos que eran únicos de las cepas asociadas con y aisladas de la marihuana. Aunque pequeños plásmidos crípticos se ven frecuentemente en microorganismos entéricos, otras *S. muenchen* que se sabe que no están relacionadas con el uso de la marihuana no contenían ninguno de estos plásmidos. La comparación con otras salmonelas no probadas previamente tampoco reveló un patrón similar. Los patrones idénticos de digestión del enzima Hpa II fueron la evidencia adicional para un solo perfil del plásmido.

No se esperaba que los dos pequeños plásmidos fueran únicos para las cepas asociadas con epidemias o con la marihuana, o que permanecieran tan estables como lo hicieron. No existe ninguna función conocida para estos plásmidos y en consecuencia ninguna presión selectiva natural o de laboratorio conocida para ellos. Es posible que cualquier cepa de *S. muenchen* con una o ninguna de estas bandas pueda haber perdido el ADN que, por definición, no es esencial para la supervivencia de la célula bacteriana. También es posible que las cepas de *S. muenchen* relacionadas con epidemias puedan adquirir un plásmido; esto sucedió sin afectar a los dos

pequeños plásmidos o a cualquier otra característica de cultivo conocida. El intestino suministra una fuente tan rica de donantes y receptores potenciales de ADN plasmídico que es muy interesante que el mapeo de fragmentos de ácidos nucleicos de *S. muenchen* asociado con la marihuana permaneciera esencialmente inalterado sobre una amplia zona geográfica y después de pasar por varios huéspedes humanos. Por lo tanto, el mapeo de fragmentos de ácidos nucleicos de plásmidos es un método útil para identificar a los microorganismos adquiridos en la comunidad que no pueden ser tipificados por otras técnicas.

\*

Estamos en deuda con los Dres. William Hall, James Alexander y Richard Goodman y con el Sr. Robert Campbell por su ayuda en la investigación epidemiológica de este brote; con la Sra. Mardi Russell y con el Dr. Carlton Turner por el análisis bioquímico de las muestras de marihuana; con la Sra. Joy Wells y el Dr. Earl Renshaw por su ayuda en la investigación de laboratorio de este brote; con la Sra. Dot Anderson por la preparación del manuscrito; y con la Sra. Charlotte Turner y los Dres. Mitchell Cohen y Paul Blake por la revisión del mismo.

## Referencias

- (1) Salmonella Surveillance Annual Summary, 1978. Atlanta, Georgia, Centros para el Control de Enfermedades, 1981.
- (2) Craven, P. C., D. C. Mackel, W. B. Baine *et al.* International outbreak of *Salmonella eastbourne* infection traced to contaminated chocolate. *Lancet* 1:788-93, 1975.
- (3) Lang, D. J., L. J. Kunz, A. R. Martin, S. A. Schroeder y L. A. Thompson. Carmine as a source of nosocomial salmonellosis. *N Engl J Med* 276:829-32, 1967.
- (4) Fontaine, R. E., S. Among, W. T. Martin *et al.* Raw hamburger: an interstate common source of human salmonellosis. *Am J Epidemiol* 107:36-45, 1978.
- (5) Multi-state outbreak of *Salmonella newport* transmitted by precooked roasts of beef. *Morbidity and Mortality Weekly Rep* 26:277-8, 1977.
- (6) Collins, R. N., M. D. Treger, J. B. Goldsby, J. R. Boring, III, D. B. Coohon y R. N. Barr. Interstate outbreak of *Salmonella newbrunswick* infection traced to powdered milk. *JAMA* 203:838-44, 1968.
- (7) Schaberg, D. R., L. S. Tompkins y S. Falkow. Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 13:1105-8, 1981.
- (8) Miettinen, O. S. Individual matching with mul-

multiple controls in the case of all-or-none responses. *Biometrics* 25:339-55, 1969.

(9) Edwards, P. R. y W. H. Ewing. Identification of Enterobacteriaceae, 3ª ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess, 1972.

(10) Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493-6, 1966.

(11) Fetterman, P. S., N. J. Doorenbos, E. S. Deith y M. W. Quimby. A sample gas liquid chromatography procedure for determination of cannabinoidic acids in *Cannabis sativa* L. *Experientia* 27:988-90, 1971.

(12) Guerry, P., D. J. LeBland y S. Falkow. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 116:1064-6, 1973.

(13) Humphreys, G. O., G. A. Willshaw y E. S. Anderson. A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* 383:457-63, 1975.

(14) Elwell, L. P., J. deGraaff, D. Seibert y S. Falkow. Plasmid-linked ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 12:404-10, 1975.

(15) Meyers, J. A., D. Sanchez, L. P. Elwell y S. Falkow. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmic deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 127:1529-37, 1976.

(16) Macrina, F. L., D. J. Kopecko, K. R. Jones, D. J. Ayers y S. M. McCowen. A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1:417-20, 1978.

(17) Radloff, R., W. Bauer e I. Vinograd. A dye-buoyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 57:1514-21, 1967.

(18) Salmonellosis traced to marijuana. Alabama Department of Public Health. Marzo 1981:2. (Communicable Disease Report No. 9).

(19) Salmonellosis and marijuana: unexpected transmission (Georgia Epidemiology Report). Atlanta, Georgia Department of Human Resources. Febrero 1981:1.

(20) The National Narcotics Intelligence Consumers Committee. Narcotics intelligence estimate: the supply of drugs to the U.S. illicit market from foreign and domestic sources in 1979. Washington, D.C., Drug Enforcement Administration, 1979.

(21) Nalin, D. R., M. M. Levine, J. Rhead et al. Cannabis, hypochlorhydria, and cholera. *Lancet* 2:859-62, 1978.